

A comparison of the Growth and Differentiation of the Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells on the Poly-L-lactic acid/Hydroxyapatite Composite Scaffold with Pure Poly-L-lactic Acid Scaffold

Fariba Mansourizadeh^{1,2}, Vahideh Miri^{3,4},
Mohsen Sagha⁵, Asadollah Asadi⁶,
Mohammad Ghasem Golmohammadi⁷

¹MSc in Biology, Department of Biology, Faculty of Biology, University of Kharazmi, Tehran, Iran

² Young Researchers and Elite Club, Islamic Azad University, Ardabil Branch, Ardabil, Iran

³MSc in Biology, Department of Biology, Faculty of Science, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

⁴Young Researchers and Elite Club, Islamic Azad University, Zahedan Branch, Zahedan, Iran

⁵ Assistant Professor, Department of Anatomy, Laboratory of Embryology and Stem cells, Faculty of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

⁶ Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

⁷ Associate Professor, Department of Anatomy, Laboratory of Embryology and Stem cells, Faculty of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

(Received August 16, 2014 ; Accepted December 16, 2014)

Abstract

Background and purpose: Natural bone is a combination of polymer and biological apatite, therefore, the composite scaffolds made of polymers and bioactive ceramics have found wide applications in bone tissue engineering studies. Among various polymers, the poly-L-lactic acid (PLLA) and hydroxyapatite (HA) have attracted much attention due to their optimal properties. In this study, using PLLA polymer and hydroxyapatite (which is similar to human bone mineral component) three-dimensional composite scaffolds were developed by Electrospinning Method. Then the behavior of human umbilical cord mesenchymal stem cells (MSCs) was investigated on the scaffolds. The aim of this research was to develop an appropriate bioactive and functional scaffold for bone tissue engineering.

Materials and methods: In this study mesenchymal stem cells were isolated from the human umbilical cord. The cells were cultured on both PLLA and PLLA/HA (10%) composite polymeric nano scaffolds. Biocompatibility of scaffolds was confirmed by MTT assay. The morphological and cell adhesion characteristics of MSCs on the scaffolds were compared using Scanning Electron Microscopic (SEM) imaging. Finally, the cells were treated with osteogenic differentiation medium for 21 days in order to investigate their differentiation potential on the scaffolds. The differentiation of the stained cells with Alizarin Red and Von Kossa were studied at 7, 14 and 21 days after cultivation.

Results: SEM studies showed that the surface properties of both scaffolds were desirable and the cells not only had the ability to attach and proliferate better on the nanocomposite scaffolds, but were also in a natural condition morphologically. The comparison of staining results indicated a higher differentiation rate in composite polymeric nano scaffold.

Conclusion: The results showed that the PLLA/HA nano scaffold could be a very good candidate for bone tissue engineering.

Keywords: Cell differentiation, Hydroxyapatite, Poly - L - lactic acid, stem cell, tissue engineering, umbilical cord

مقایسه رشد و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف جنین انسانی بر روی داربست کامپوزیتی پلی-آل-لاکتیک اسید / هیدروکسی آپاتیت با داربست پلی-آل-لاکتیک اسید خالص

فریبا منصوری زاده^{۱،۲}، وحیده میری^{۳،۴}،

دکتر محسن سقا^۵، دکتر اسداله اسدی^۶،

دکتر محمدقاسم گل محمدی^۷

چکیده

سابقه و هدف: داربست‌های کامپوزیتی ساخته شده از پلیمرها و سرامیک‌های زیست فعال، به دلیل اینکه استخوان طبیعی ترکیبی از پلیمر و آپاتیت زیستی است، کاربرد وسیعی در مطالعات مهندسی بافت استخوان پیدا کرده‌اند. در این مطالعه، با استفاده از پلی-آل-لاکتیک اسید (PLLA) و هیدروکسی آپاتیت (HA)، که به بخش معدنی استخوان انسان شباهت دارد، نانو داربست کامپوزیتی سه بعدی به روش الکتروریسی تهیه و رفتار سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف انسانی روی آن‌ها بررسی شد. هدف از انجام این پژوهش ساخت و توسعه داربستی مناسب و زیست فعال برای کاربرد در مهندسی بافت استخوان است.

مواد و روش: در مطالعه حاضر سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بندناف انسانی جداسازی شد و برای تأیید بنیادینگی سلول‌ها آنالیز فلوسایتومتری صورت گرفت. سپس سلول‌ها بر روی نانوداربست‌های پلیمری PLLA و کامپوزیت PLLA/HA(10%) کشت داده شدند. زیست سازگاری داربست‌ها به وسیله سنجش MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) مورد بررسی قرار گرفت. موفولوژی و نحوه اتصال سلول بر سطح هر دو نوع داربست به وسیله تصاویر میکروسکوپ الکترونی مورد مطالعه قرار گرفتند و در نهایت برای بررسی توان تمایزی سلول‌ها در سطح داربست‌ها، از محیط تمایزی استخوانی به مدت ۲۱ روز استفاده و روند تمایز طی روزهای ۷، ۱۴، ۲۱ با رنگ آمیزی آلیزارین قرمز و ون کوسا بررسی شد.

یافته ها: تصاویر میکروسکوپ الکترونی نگاره نشان‌دهنده خصوصیات سطحی مناسب در هر دو داربست بود و سلول‌ها نه تنها توانایی اتصال و تکثیر مناسب‌تری را روی نانو کامپوزیت داشتند، بلکه به لحاظ ریخت‌شناسی نیز از شرایط طبیعی برخوردار بودند. مقایسه نتایج رنگ آمیزی بیانگر میزان بالای تمایز در داربست کامپوزیت نسبت به داربست تنها و نمونه‌های سلولی بود.

استنتاج: برای ترمیم و بازسازی بافت استخوان داربست زیست فعال کامپوزیتی PLLA/HA در مقایسه با داربست PLLA خالص، داربست مناسب‌تری است.

واژه های کلیدی: تمایز سلولی، هیدروکسی آپاتیت، پلی-آل-لاکتیک اسید، سلول‌های بنیادی، مهندسی بافت، بند ناف

مؤلف مسئول: محمدقاسم گل محمدی - دانشیار علوم تشریحی، آزمایشگاه تحقیقاتی جنین شناسی و سلول‌های بنیادی، گروه علوم تشریحی و پاتولوژی، دانشکده

Email: m.golmohammadi@arums.ac.ir

پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، ایران

۱. کارشناس ارشد زیست شناسی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

۲. دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، اردبیل، ایران

۳. کارشناس ارشد زیست شناسی، گروه زیست شناسی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

۴. دانشگاه آزاد اسلامی واحد زاهدان، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، زاهدان، ایران

۵. استادیار علوم تشریحی، آزمایشگاه تحقیقاتی جنین شناسی و سلول‌های بنیادی، گروه علوم تشریحی و پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

۶. استادیار بیوفیزیک، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

۷. نویسنده مسئول: دانشیار علوم تشریحی، آزمایشگاه تحقیقاتی جنین شناسی و سلول‌های بنیادی، گروه علوم تشریحی و پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

تاریخ تصویب: ۹۳/۹/۲۵

تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۹۳/۷/۲۲

تاریخ دریافت: ۹۳/۵/۲۵

مقدمه

تاکنون رهیافت‌ها و روش‌های متعددی؛ از بکارگیری ایمپلنت‌های فلزی گرفته تا روش‌های پیشرفته ژن‌درمانی و رهایش هورمون‌های رشد از سوی محققان و دانش‌پژوهان برای معالجه نقایص استخوانی ارائه شده است. در این رابطه زیست‌موادهای مختلفی مورد استفاده و مطالعه قرار گرفته‌اند و قابلیت آن‌ها در بازسازی نقایص استخوانی به وسیله آزمایش‌های متعدد درون بدنی و برون بدنی ارزیابی شده است (۱). در این میان زیست‌موادهای تخریب‌پذیر از جایگاه ویژه‌ای برخوردار هستند. استفاده از این زیست‌موادها علاوه بر اینکه نارسایی‌ها و معایب ناشی از بکارگیری ایمپلنت‌های فلزی را بر طرف می‌کند، امکان بازسازی سریع‌تر استخوان را با کیفیت ساختاری به مراتب مناسب‌تری فراهم می‌کند؛ به‌ویژه هنگامی که استفاده از این مواد تخریب‌پذیر با سلول‌های بنیادی استخوان ساز توأم شود (۲). بکارگیری زیست‌موادهای تخریب‌پذیر باب جدیدی را در مبحث ترمیم استخوان گشوده است که تحت عنوان «مهندسی بافت استخوان» شناخته می‌شود. هدف از مهندسی بافت تقلید از طبیعت برای حل محدودیت‌های معالجات کلینیکی و درمانی است (۳،۴). مهندسی بافت بر اساس سه ترکیب اصلی بافت‌های بیولوژیکی یعنی ماتریکس خارج سلولی، مولکول‌های پیام‌رسان و سلول بنیان‌نهاد شده است، که به ترتیب به‌وسیله داربست، فاکتورهای رشد و سلول شبیه‌سازی می‌شود. داربست‌ها به اشکال مختلف همچون ژل، فوم، فیبر، میکرونانو ذرات و غشاء هستند که با مولکول‌های پیام‌رسان که در فرآیندهای ریخت‌زایی، شکل‌گیری و تمایز سلولی نقش دارند، همراه می‌شوند (۵).

پلیمرهای سنتزی به‌طور گسترده‌ای در مهندسی بافت برای ساخت داربست بکار می‌روند. زیست‌سازگاری و قابلیت جذب این پلیمرها زمینه استفاده

گسترده آن‌ها را در مهندسی بافت به‌صورت داربست‌های موقتی یا به‌عنوان حامل برای تحویل مولکول‌های زیست‌فعال فراهم می‌کند. پلی-آل-لالتیک اسید (PLLA) از جمله پلیمرهایی است که از سوی سازمان غذا و دارو (FDA) برای مطالعات مهندسی بافت مورد تأیید قرار گرفته است (۴، ۶).

داربست‌های کامپوزیت پلیمر/سرامیک از جایگاه ویژه‌ای در مهندسی بافت استخوان برخوردار هستند. تحقیقات نشان داده که بکارگیری سرامیک‌ها، به‌خصوص سرامیک‌های فسفات کلسیمی همچون هیدروکسی آپاتیت، در کنار مواد پلیمری، علاوه بر امکان حصول خواص مکانیکی بهتر، درجه زیست‌سازگاری و قابلیت استخوان‌سازی ایمپلنت را نیز به میزان چشمگیری افزایش خواهد داد (۷، ۸).

استفاده از نانوفیبرها در ساخت داربست‌ها به دلیل افزایش نسبت سطح به حجم و در نتیجه افزایش برهم‌کنش سلول با داربست، نسبت به داربست‌های ساخته شده با روش‌های مرسوم مزیت محسوب می‌شود (۹). برای ساخت نانوفیبرها می‌توان از روش‌های جدایی فاز، سنتز الگوی^۱، طراحی^۲، خودتجمعی یا الکتروریسی استفاده کرد. الکتروریسی مقرون به صرفه‌تر، ساده‌تر و با بهره‌وری بالاتری است که می‌تواند برای تولید انواع مختلفی از نانو الیاف‌ها بکار رود. تنظیم دقیق پارامترهای این روش اجازه حصول نانوفیبرهای با قطر ۵۰ تا ۵۰۰ نانومتر را فراهم می‌کند.

از میان انواع سلول‌های به کار برده شده در مهندسی بافت، سلول‌های بنیادی با توجه به ویژگی‌های منحصربه‌فردی چون تمایز به انواع سلول‌ها و خودنوزایی از نظر ترمیم بافت ضایعه دیده انتخاب مناسبی بوده و بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند (۴). سلول‌های بنیادی مزانشیمی ماتریکس بند ناف در سال‌های اخیر با توجه به سهولت تهیه، خواص آنتی‌ژنی کم و قابلیت

¹ Template synthesis² Drawing

تکثیر و تمایز به سایر رده‌های سلولی، مورد توجه زیادی قرار گرفته و پیشنهاد شده است، از آن‌ها در سلول درمانی و برای اصلاح ساختارهای بیولوژیک آسیب دیده استفاده شود (۷، ۸).

هدف از انجام این پروژه ساخت یک نانوداربست زیست سازگار و زیست تخریب پذیر و بررسی روند رشد و تمایز یک منبع سلولی جدید و مناسب برای ترمیم و بازسازی نقایص استخوانی است، به طوری که به بهترین وجه ممکن بتواند تشکیل بافت جدید استخوانی را در بدن بیمار القا کند و در عین حال کمترین عوارض جانبی را نیز برای بیمار در پی داشته باشد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع تجربی است که در آن مواد و روش‌های زیر مورد استفاده قرار گرفت.

ساخت داربست PLLA/HA و PLLA

داربست‌ها به روش الکتروریسی ساخته شدند. به این منظور دو سری محلول پلیمری تهیه شد. برای ساخت محلول اول پلیمر PLLA (Sigma-Aldrich, Germany) با ویسکوزیته ذاتی یک، با غلظت ۴ درصد در حلال کلروفرم+دی متیل فرمالدهید (۸ V/V) در حلال (Sigma-Aldrich, Germany) کاملاً حل شد تا تعلیق پایداری ایجاد شود. محلول دوم همانند محلول پلیمری اول به اضافه ۱۰ درصد هیدروکسی آپاتیت (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) تهیه شد. به عبارتی در این مرحله پلیمر PLLA و نانوذرات هیدروکسی آپاتیت با نسبت وزنی ۱۰ به ۱، در حلال کلروفرم و DMF حل شد. محلول پلیمری به داخل سرنگ دستگاه الکتروریسی (Diener Electronics, Germany) منتقل و سپس سوزن سرنگ (با قطر داخلی ۰/۵ میلی متر) به جریان ولتاژ وصل و الکتروود بعدی به سطح ورقه آلومینیمی متصل شد. سرعت تزریق محلول برابر ۱۵ ml/h و تنظیم و بین سوزن و جمع کننده ولتاژ قوی ۱۵

کیلوولت ایجاد شد. نانوالیاف تشکیل شده، روی ورق آلومینیمی ($7 \times 20 \text{ cm}^2$) که درفاصله ۱۵ سانتی متری از نوک سوزن قرار داشت، جمع آوری شد. الکتروریسی در محیط آزمایشگاه با دمای حدود ۲۵ درجه سانتی گراد طی شش ساعت انجام شد (۱۰). برای غلبه بر خواص آبرگریزی پلیمر PLLA و تغییر ویژگی سطح داربست در راستای افزایش نشست سلولی، تیمار پلاسما با گاز اکسیژن تحت فشار ۰/۴ میلی بار و به مدت ۴ دقیقه انجام شد (۱۱).

مطالعه موفقولوژی داربست‌ها به وسیله میکروسکوپ الکترونی

برای بررسی تفاوت‌های موفقولوژیکی داربست‌های الکتروریسی شده PLLA/HA و PLLA با یکدیگر، تصاویر میکروسکوپ الکترونی (LEO1430VP) تهیه شد. به این منظور ابتدا داربست‌ها در قطعات کوچک برش و سپس پوشش طلا داده و در نهایت در محل مخصوص دستگاه قرار گرفته و تصاویر لازم تهیه شدند (۱۲).

جداسازی و کشت اولیه سلول‌های استرومای بند ناف بند ناف نوزاد سالمی که به روش سزارین متولد شده بود، با کسب رضایت از والدین، در شرایط استریل و در داخل نرمال سالین به آزمایشگاه انتقال داده شد. برای جداسازی سلول‌ها، بند ناف به قطعات ۱ الی ۲ سانتی متری بریده و به پتری دیش حاوی HBSS (BI.R.D Baharafshan) انتقال داده شد تا خون باقی مانده در داخل رگ‌ها کاملاً شسته شود. سپس با ایجاد برش عرضی بر روی قطعات بند ناف، رگ‌ها از بافت بینابینی جدا شدند. بافت باقی مانده که شامل ژله و ارتون بود، با پنس جدا شده و برای کشت در فلاسک‌های T25 قرار گرفت. برای این منظور از محیط کشت DMEM با گلوکز پایین (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) به همراه FBS ۲۰ درصد و آنتی بیوتیک (پنی سیلین و استرپتو مایسین-Gibco) یک درصد برای

جلوگیری از آلودگی استفاده شد. سپس فلاسک کشت در انکوباتور دارای رطوبت، 5CO_2 درصد و دمای 37°C درجه سانتی گراد قرار گرفت. محیط کشت هر چهار روز یکبار تعویض و سلول‌های غیر چسبنده شسته شدند (۱۳).

بررسی خصوصیات سلول‌های بنیادی جدا شده از استرومای بند ناف

حدود ده روز پس از قرار دادن قطعات ژله وارتون در محیط کشت، جوانه‌های سلولی از کناره‌های این قطعات شروع به رشد کردند و طی هفته‌های بعد که سلول‌ها کف فلاسک را پوشاندند، زیر میکروسکوپ معکوس مورد بررسی قرار گرفتند.

فلوسایتومتری

برای تأیید استخراج سلول‌های بنیادی مزانشیمی آنالیز فلوسایتومتری صورت گرفت. به این منظور برای هر مارکر یک ویال برای تست و ویالی به عنوان ایزوتیپ کنترل در نظر گرفته و پس از سومین پاساژ به هر ویال تعداد 10^5 - 10^6 سلول اضافه شد. ویال‌ها به مدت ۳۰ دقیقه با یک میلی‌لیتر محلول $\text{PBS}-3\% \text{BSA}$ بلاک شدند. سپس با غلظت مناسبی از آنتی‌بادی‌های آنتی- $\text{CD}105$ ، $\text{CD}90$ ، $\text{CD}45$ به مدت ۴۵ دقیقه انکوبه و در انتها ایزوتایپ کنترل با غلظت مناسب به مدت ۳۰ دقیقه در دمای 37°C انکوبه شد. آنتی‌بادی ثانویه با رقت ۱ به ۴ افزوده و به مدت ۴۵ دقیقه در دمای 37°C انکوبه شد. سپس حجم را با PBS به یک میلی‌لیتر رسانیده و سوسپانسیون سانتیفریژ شد. در مرحله آخر رسوب سلولی با ۲۰۰ میکرولیتر پارافرمالدهید ۴ درصد سوسپانسیون شد و آنالیز فلوسایتومتری روی آن‌ها انجام گرفت.

کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف بر روی داربست‌های PLLA و PLLA/HA

ابتدا داربست‌ها به ابعاد 1×1 سانتی متر مربع بریده شده و به مدت ۲۴ ساعت در اتانول ۷۰ درصد غوطه‌ور

شدند. پس از خشک شدن داربست‌ها در دمای اتاق، دو طرف آن‌ها، هر کدام به مدت یک ساعت با قرار گرفتن تحت اشعه UV استریل شد. سپس داربست‌ها درون چاهک‌های پلیت ۲۴ خانه قرار داده و به دنبال آن با PBS شستشو داده شدند و به مدت سه ساعت تحت تیمار PBS (Gibco) در انکوباتور 37°C درجه سانتی گراد و 5CO_2 درصد قرار گرفتند. پس از تخلیه بافر سلول‌ها در تراکم 2×10^5 سلول در هر میلی‌لیتر با روش چکاندن و به مقدار ۲۰ میکرو لیتر بر روی هر دو نوع داربست قرار داده شدند و پلیت حاوی داربست به مدت سه ساعت برای نفوذ کامل سلول‌ها به درون داربست، در انکوباتور قرار گرفت. سپس ۵۰۰ میکرو لیتر محیط کشتبه همراه FBS ۲۰ درصد و آنتی بیوتیک (پنی سیلین و استرپتو مایسین) یک درصد به محیط داربست‌ها اضافه شد.

بررسی زیست سازگاری داربست

برای بررسی زیست سازگاری داربست‌های PLLA و PLLA/HA ، سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف انسانی به روش ذکر شده در مرحله قبل بر روی داربست‌ها کشت داده شدند. در سه بازه زمانی مشخص (روزهای ۳، ۵ و ۷) داربست‌های کشت داده شده با سلول به پلیت ۲۴ خانه جدید منتقل و با بافر PBS شستشو داده شدند. محلول MTT $3-[4,5\text{-dimethylthiazol-2-yl}]-2,5\text{-diphenyltetrazolium bromide}$ (Merck, Germany) با غلظت ۵ میلی گرم در میلی‌لیتر در غلظت نهایی ۱۰ درصد با محیط کشت RPMI (GIBCO) به هر چاهک پلیت کشت سلولی اضافه شد. سپس پلیت‌ها به مدت چهار ساعت درون انکوباتور با دمای 37°C درجه سانتی گراد و رطوبت ۹۸ درصد و 5CO_2 درصد قرار داده شدند. پس از چهار ساعت انکوباسیون، محیط روی سلول‌ها به آرامی خارج شده و میزان ۱۰۰ میکرو لیتر حلال DMSO (Merck, Germany) برای حل شدن کریستال‌های فورمازان ارغوانی رنگ حاصل از احیای MTT به هر چاهک اضافه شد. میزان جذب نوری (OD) رنگ

حاصله در هر نمونه که رابطه مستقیم با تعداد سلول‌های فعال از نظر متابولیسی دارد، به وسیله دستگاه الیزا ریدر (URIT-660, China) در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه گیری شد (۱۴). (آزمایش سه بار تکرار و نتایج به صورت میانگین ارائه شده است).

تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف به استئوبلاست بر روی داربست

تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف به استئوبلاست بر روی هر دو نوع داربست انجام شد تا اثر هیدروکسی آپاتیت در فرایند تمایز استئوبلاستی در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گیرد. بدین منظور از سلول‌های پاساژ سوم استفاده شد. ابتدا سلول‌ها طبق روش ذکر شده، بر روی داربست‌ها و در پلیت‌های ۲۴ خانه‌ای کشت داده شدند، روز بعد محیط کشت چاهک‌های حاوی داربست خارج شده و پس از شستشوی داربست-سلول با بافر PBS، محیط تمایز استئوبلاستی اضافه شد. محیط تمایز استئوبلاستی حاوی ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اسکورییک اسید سه فسفات (Ascorbic acid 3-phosphate; Sigma-) Aldrich, St Louis, USA)، ۱۰ نانومولار دگزامتازون (Dexamethasone; Sigma-Aldrich, St Louis, USA) و ۱۰ میلی‌مولار بتاگلیسرول (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) و مدت تیمار ۲۱ روز بود و تعویض محیط هر دو روز یکبار انجام شد (۱۳).

بررسی تمایز استئوبلاستی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف رنگ آمیزی آلزارین قرمز

برای بررسی تمایز استئوبلاستی سلول‌ها در شرایط بدون داربست و نیز سلول‌های موجود بر روی داربست‌ها، از رنگ آمیزی آلزارین قرمز (Merk, Germany) استفاده شد. رنگ آمیزی در روزهای ۷ و ۱۴ و ۲۱ کشت انجام گرفت. برای این منظور محیط کشت برداشته شد و سلول‌ها با PBS شستشو داده شدند، سپس سلول‌ها با فرمالدهید ۴

درصد (Merk, Germany) و به مدت ۲۰ دقیقه تثبیت و مجدداً با PBS شستشو داده شدند. در نهایت رنگ آلزارین قرمز یک درصد اضافه شده و به مدت ۸ دقیقه انکوبه شدند. سپس با آب مقطر چندین بار شستشو داده و در زیر میکروسکوپ از نظر وجود رسوب‌های قرمز کلسیم ارزیابی شدند. تمامی مراحل رنگ آمیزی برای MSCs بدون محیط تمایزی نیز به عنوان شاهد انجام شد. برای رنگ آمیزی سلول‌های تمایزی بر روی داربست‌ها نیز، داربست بدون سلول به عنوان شاهد رنگ آمیزی شد (۱۳).

رنگ آمیزی ون کوسا

بررسی تمایز با استفاده از روش رنگ آمیزی ون کوسا^۳ نیز انجام شد. طبق آزمون قبلی ابتدا نمونه‌ها تحت تثبیت با پارافرمالدهید ۴ درصد قرار گرفتند، سپس محلول نترات نقره (Merk, Germany) یک درصد به نمونه‌ها اضافه شد و پلیت‌ها در حالی که از زیر با فویل آلومینیومی پوشانده شده بودند به مدت ۳۰ دقیقه تحت تابش نور فرا بنفش قرار گرفتند. بعد از خارج کردن محلول نترات نقره، پلیت‌ها چندین بار با آب مقطر شستشو داده شدند و به مدت ۵ دقیقه تحت تیمار محلول تیوسولفات سدیم (Merk, Germany) ۲/۵ درصد قرار گرفتند و بعد از شستشو با آب مقطر در هوای اتاق خشک شدند و در نهایت برای ارزیابی تولید کلسیم با میکروسکوپ معکوس مورد بررسی قرار گرفتند (۱۴).

نتایج

بررسی موفقولوژی داربست‌ها به وسیله میکروسکوپ الکترونی

میکروگراف‌های الکترونی تهیه شده از سطوح داربست‌های PLLA و PLLA/HA در شکل یک آمده است. هر دو نانو داربست دارای ساختمان متخلخل با منافذ مرتبط بهم و الیاف باریک بودند. تصویر داربست

³ Von Kossa

مشاهده می‌شود، سلول‌های جدا شده ابتدا به صورت کلنی‌های معجزا به کف فلاسک چسبیده‌اند و سپس در اثر تکثیر سلول‌ها، اندازه کلنی‌ها بزرگ‌تر شده و به تدریج کف فلاسک با سلول پوشانده شده است.

نتایج حاصل از فلوسایتومتری

نتایج حاصل از فلوسایتومتری نشان‌دهنده بیان بالای نشانگرهای بنیادی مزانشیمی بندناف است میزان بیان شاخص‌های بنیادینگی CD ۹۰ و CD ۱۰۵ با توجه به مارکر M۲ به ترتیب برابر ۹۴ و ۹۰ درصد و شاخص CD۴۵ که یک شاخص غیربنیادینگی کمتر از ۲ درصد است.

کشت سلول بر روی داربست‌ها

مورفولوژی و نحوه اتصال سلول‌ها بر روی سطح داربست‌ها به وسیله تصاویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی (تصویر شماره ۴) مورد مطالعه قرار گرفت. تصاویر نشان‌دهنده اتصال موفق سلول‌ها بر روی هر دو داربست است. نکته قابل توجه میزان سلول‌های اتصال یافته است که در داربست‌های نانو کامپوزیت نسبت به داربست PLLA، بیشتر است و بیانگر فراهم‌سازی سطوح بهتر داربست‌های نانو کامپوزیت نسبت به داربست PLLA برای رشد و اتصال سلولی است.

زیست‌سازگاری داربست‌ها

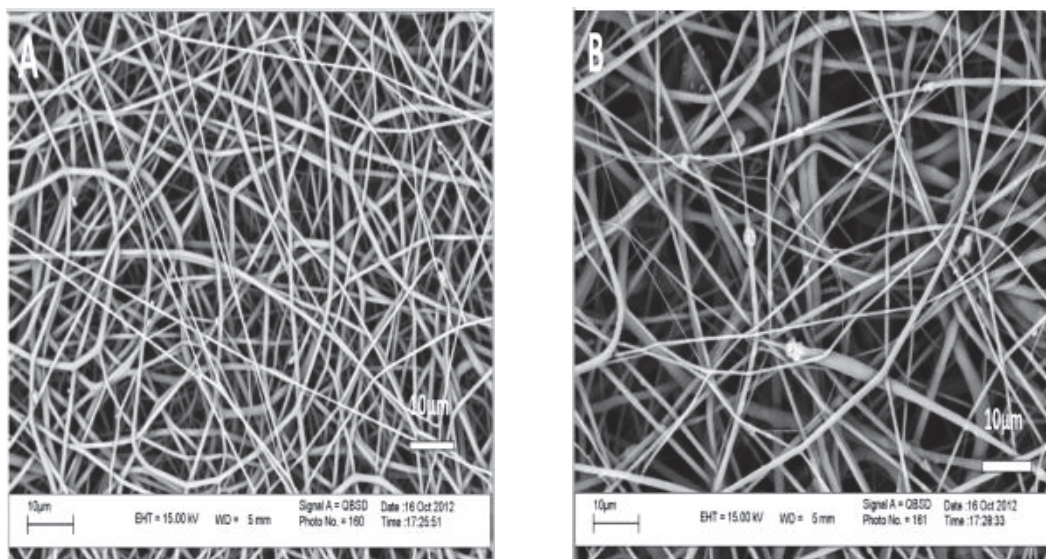
میزان زیست‌سازگاری سلول‌ها در این سنجش بر مبنای کاهش فعالیت آنزیم میتوکندریایی در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بند ناف انسانی کشت شده بر روی داربست‌ها، با استفاده از روش MTT تعیین شد. همان‌گونه که در نمودار شماره ۱ مشخص است، میزان زیست‌سازگاری این سلول‌ها روی داربست نانو کامپوزیت نسبت به داربست تنها، به مراتب بیشتر است. با توجه به این نمودار، حداکثر رشد و تکثیر سلولی روی نانو کامپوزیت در روز هفتم حاصل شده است (اختلاف معنی‌داری در میانگین داده‌ها دیده نشد).

PLLA/HA نشان دهنده پراکندگی یکسان ذرات HA بر روی الیاف PLLA است. جایگزین کردن ذرات HA در داربست PLLA منجر به ایجاد سطح ناهموار و بزرگ‌تری شده است که سبب افزایش اتصالات و گسترش رشد سلول‌های بنیاد مزانشیمی در سطح داربست می‌شود.

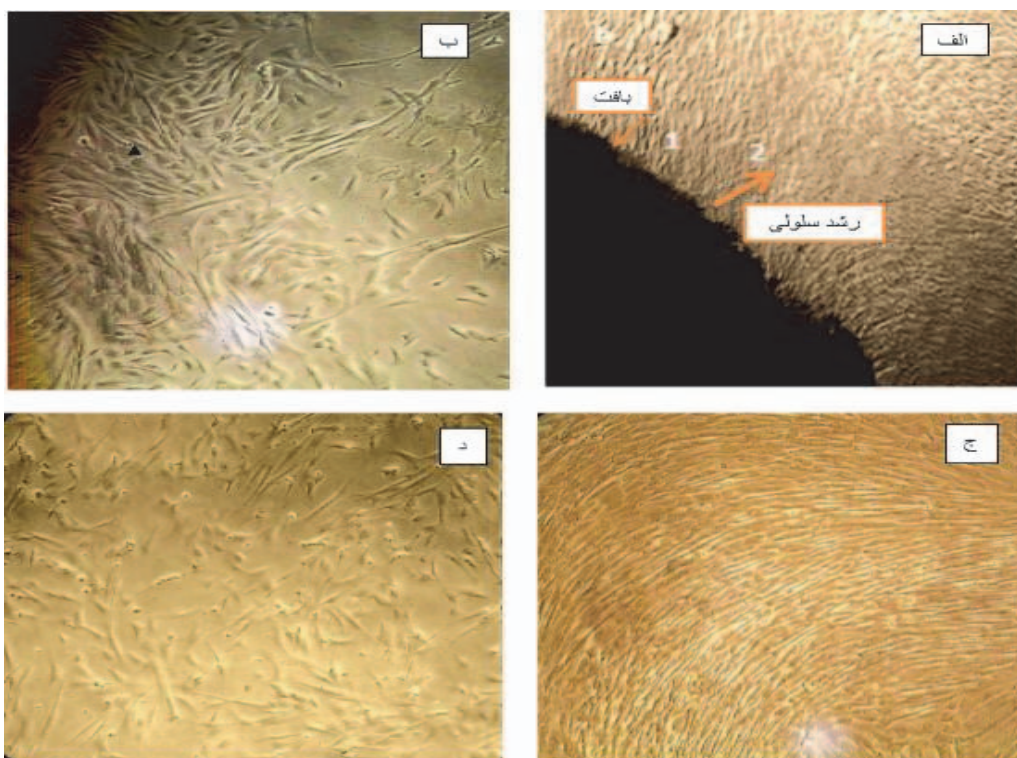
بررسی مورفولوژی داربست‌ها به وسیله میکروسکوپ الکترونی میکروگراف‌های الکترونی تهیه شده از سطوح داربست‌های PLLA و PLLA/HA در شکل یک آمده است. هر دو نانو داربست دارای ساختمان متخلخل با منافذ مرتبط بهم و الیاف باریک بودند. تصویر داربست PLLA/HA نشان دهنده پراکندگی یکسان ذرات HA بر روی الیاف PLLA است. جایگزین کردن ذرات HA در داربست PLLA منجر به ایجاد سطح ناهموار و بزرگ‌تری شده است که سبب افزایش اتصالات و گسترش رشد سلول‌های بنیاد مزانشیمی در سطح داربست می‌شود.

استخراج سلول‌های بنیادی مزانشیمی

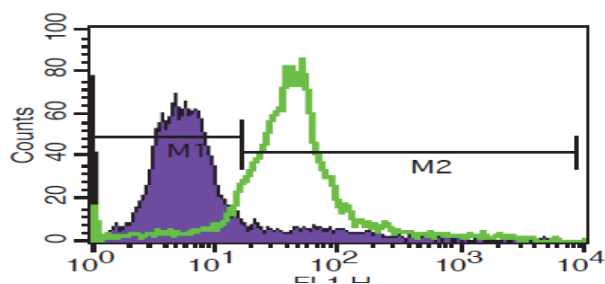
سه روز بعد از جداسازی، محیط کشت اولیه تعویض شد. ۱۰ تا ۱۲ روز پس از قرار دادن قطعات ژله وار تون در محیط کشت، جوانه‌های سلولی از کناره‌ها شروع به رشد کردند و یک هفته بعد از آن کف پلیت‌ها را پوشاندند. طی کلیه مراحل، سلول‌های استرومایی بند ناف، با میکروسکوپ معکوس مورد بررسی قرار گرفتند که سلول‌هایی شبیه به سلول‌های فیبروبلاستی با زوایدی به اطراف کشیده و چسبیده به بستر فلاسک کشت بودند. زمانی که ۸۰ درصد از کف فلاسک کشت با سلول‌های چسبیده فیبروبلاستی شکل اشغال شدند، پاساژ داده و سلول‌های مرده و شناور از محیط حذف و سلول‌های زنده به چند فلاسک تقسیم شدند. نتیجه اولین پاساژ بعد از کشت، تولید رده سلولی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف انسان بود. همان‌طور که در تصویر شماره ۲



تصویر شماره ۱: تصویر SEM (scanning electron microscopy) از سطح هر دو داربست PLLA خالص (تصویر A) و داربست کامپوزیت PLLA/HA (تصویر B). از لحاظ مورفولوژی هر دو داربست دارای ساختمان متخلخل با منافذ مرتبط بهم هستند. داربست PLLA/HA پراکندگی یکسان ذرات بر روی الیاف PLLA است که از نظر فیزیکی سطح خشن‌تر و بزرگ‌تری را برای اتصال بهینه سلول‌ها فراهم می‌کند. (خط شاخص = ۱۰ میکرومتر)

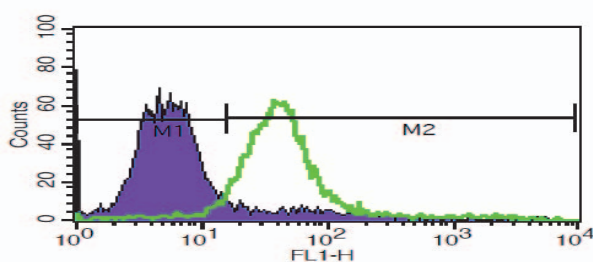


تصویر شماره ۲: تصاویر حاصل از MSC استخراج شده از ماتریکس بند ناف (تمامی تصاویر با بزرگ‌نمایی $200\times$ تهیه شده است). الف) رشد جوانه‌های سلولی از کناره‌های بافت ژله وارنون در روز ۱۲ کشت. ب) سلول‌های فیروپلاستی با زوایدی به اطراف کشیده و چسبیده به بستر فلاسک در روز ۱۵ کشت. ج) تشکیل کلنی سلولی و هم‌شماری صد درصد سلول‌ها و تشکیل یک لایه سلولی، در روز ۱۷ کشت. د) سلول‌های پاساژ اول P1.



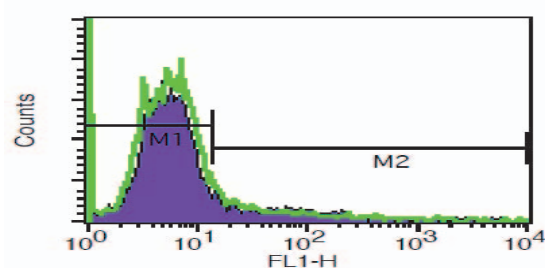
File: CD105

Marker	% Gated
All	100.00
M1	9.87
M2	90.27



File: CD 90

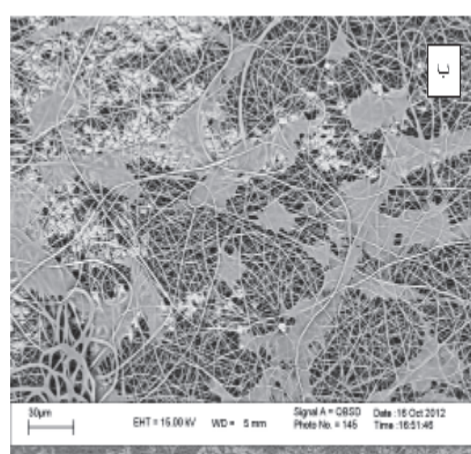
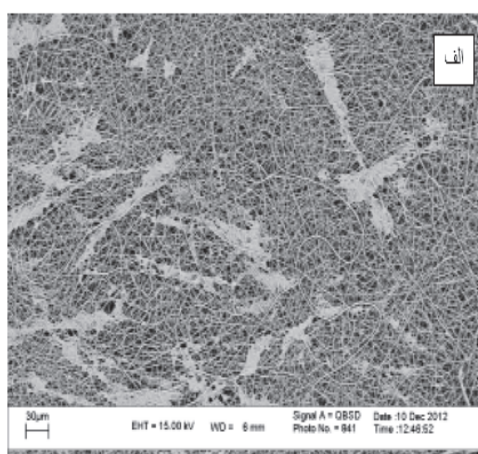
Marker	% Gated
All	100.00
M1	5.97
M2	94.27



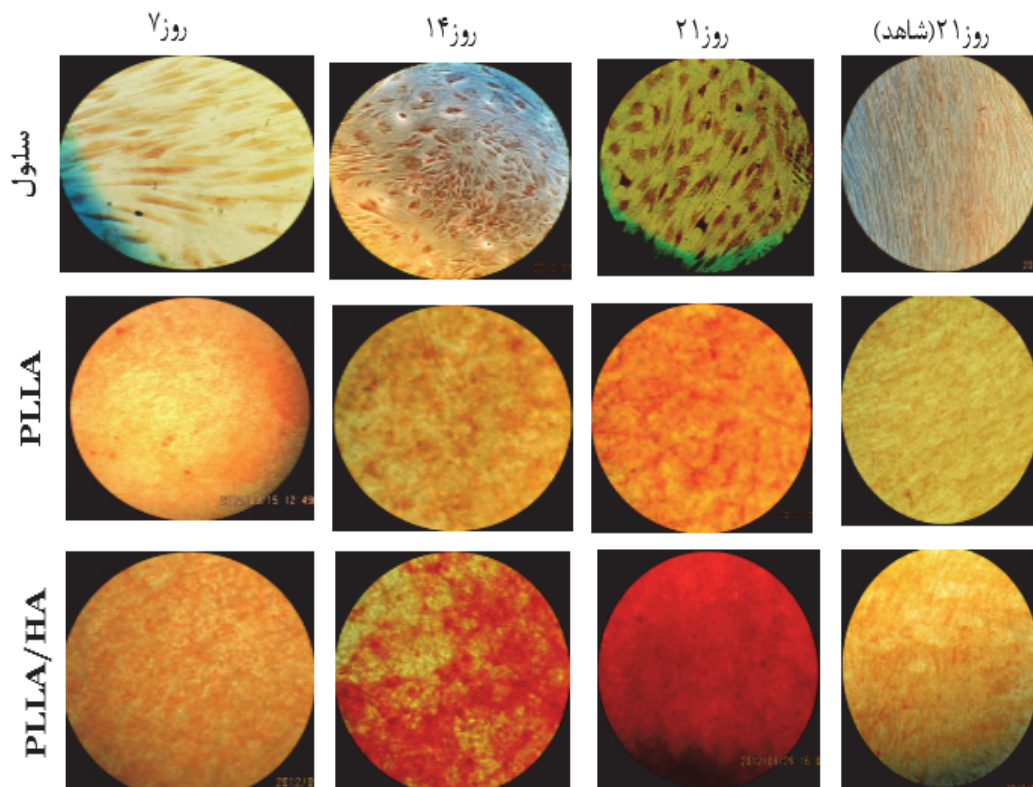
File: CD45

Marker	% Gated
All	100.00
M1	89.18
M2	1.82

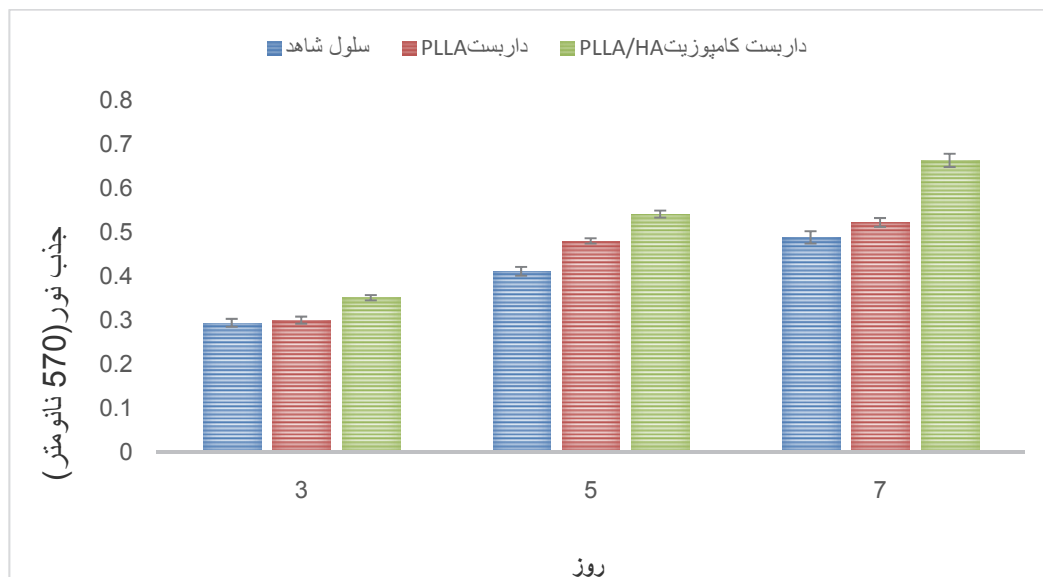
تصویر شماره ۳: هیستوگرام‌های مربوط به فلوسایتومتری مارکرهای اختصاصی CD45، CD90، CD105 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی ماتریکس بند ناف. در هر نمودار منحنی توخالی مربوط به مارکر مورد بررسی و نمودار آبی مربوط به ایزوتیپ کنترل است، درصد بیان شاخص‌های بنیادینگی در نمونه سلول‌های بنیادی مزانشیمی بالای ۹۰ درصد است.



تصویر شماره ۴: تصویر میکروسکوپ الکترونی از اتصال سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف بر روی داربست‌ها ۲۴ ساعت بعد از کشت. میزان سلول‌های اتصال یافته در سطح داربست نانو کامپوزیت نسبت به داربست PLLA، بیشتر است. الف) PLLA (خط شاخص=۳۰ میکومتر) ب) PLLA/HA (خط شاخص=۱۰ میکومتر).



تصویر شماره ۵: تصاویر سلول‌ها طی روند تمایز در محیط دو بعدی (شاهد) و سطح داربست PLLA و PLLA/HA که به روش رنگ آمیزی آلزارین قرمز تهیه شده است. رنگ قرمز نشان دهنده ی میزان رسوب کلسیم در محیط کشت سلول است. (تهیه شده بوسیله میکروسکوپ معکوس با بزرگنمایی ۲۰X)



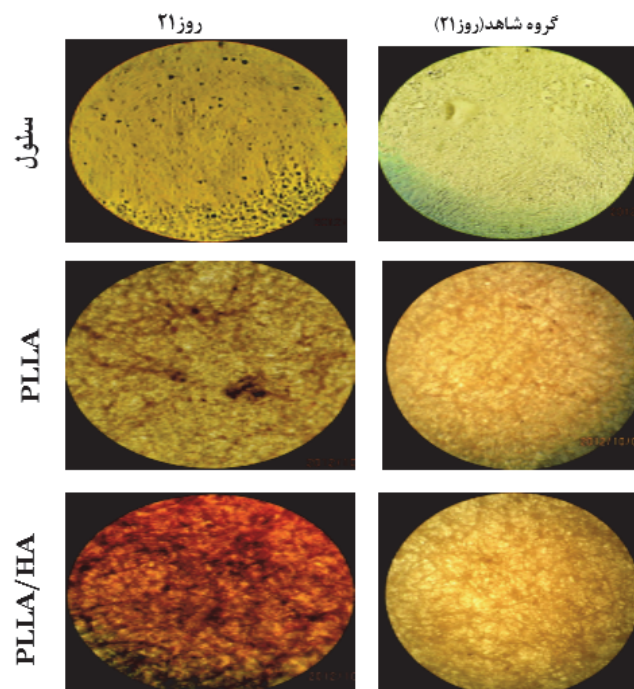
نمودار شماره ۱: نمودار MTT برای بررسی میزان بقاء سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف بر روی داربست‌های PLLA و PLLA/HA در روزهای سوم، پنجم و هفتم بعد از کشت، همان‌طور که مشاهده می‌شود، در هر سه روز میزان زیست‌سازگاری این سلول‌ها روی داربست نانو کامپوزیت نسبت به داربست تنها، به مراتب بیشتر است. با توجه به این نمودار، می‌توان گفت، حداکثر رشد و تکثیر سلولی روی نانو کامپوزیت در روز هفتم حاصل شده است.

تأیید تمایز استئوبلاستی

رنگ آمیزی آلزارین قرمز و ون کوسا

رنگ آمیزی آلزارین رد و ون کوسا از پرکاربردترین روش‌ها برای تشخیص میزان رسوبات کلسیمی در محیط کشت استئوزنیک است. سلول‌های کشت شده بر روی هر دو نوع داربست که به مدت سه هفته در معرض محیط القاء تمایز به استخوان قرار گرفته بودند با رنگ آمیزی اختصاصی آلزارین قرمز و ون کوسا مورد ارزیابی قرار گرفتند. مشاهده رسوب توده‌های کلسیمی، تأییدی بر تمایز استئوبلاستی MSCs است. اولین نشانه‌های تغییرات موفولوژیکی و تمایز به استخوان، هفت روز پس از القای تمایز مشاهده شد. در پایان دوره تمایز (۲۱ روز) توده‌های سلولی مقدار فراوانی ماتریکس معدنی ترشح کرده بودند. در بررسی نتایج رنگ آمیزی سلول‌های تحت تیمار تمایزی

در روز ۲۱ و در شرایط بدون داربست، سلول‌ها به دلیل رسوب کلسیم به رنگ قرمز دیده می‌شوند و در وسط تصویر توده‌ای از سلول‌ها تشکیل ندول استخوانی داده‌اند. در رنگ آمیزی سلول‌های بنیادی شاهد که فاقد محیط تمایزی بوده و همچنین داربست کنترل که بدون سلول بودند، نمونه‌ها هیچ رنگی به خود نگرفتند (تصویر شماره ۵). داربست‌های حاوی سلول نیز که پس از ۲۱ روز تیمار تحت محیط تمایزی، رنگ آمیزی شد به دلیل رسوب توده‌های کلسیمی در رنگ آمیزی با آلزارین رد به رنگ قرمز درآمد و در رنگ آمیزی با ون کوسا به رنگ خاکستری شد. البته شدت رنگ در داربست کامپوزیت نسبت به داربست تنها به‌طور قابل ملاحظه‌ای بیشتر بود که نشان‌دهنده رسوب کلسیمی بیشتر و تمایز بالاتر سلول‌ها در سطح داربست کامپوزیت است (تصاویر ۵ و ۶).



شکل ۶: تصاویر سلول‌ها در روز ۲۱ تمایز در محیط دو بعدی (شاهد) و سطح داربست PLLA و PLLA/HA که به روش رنگ آمیزی ون کوسا تهیه شده است. رنگ خاکستری نشان دهنده ی میزان رسوب فسفات در محیط کشت سلول است. (تهیه شده بوسیله میکروسکوپ معکوس با بزرگمایی ۲۰X).

بحث

مهم‌ترین گام در مهندسی بافت، انتخاب بيو مواد مناسب برای ساخت داربست است (۱۵). داربست مطلوب الگویی برای بازسازی بافت است و نقش کلیدی در شکل‌گیری ساختار نهایی بافت مهندسی شده و عملکرد نهایی آن بر عهده دارد (۱۶). بیومواد مورد استفاده در داربست باید از چسبندگی، رشد و تکثیر سلولی هم در شرایط *In vivo* و هم در *In vitro* حمایت به عمل آورند (۱۷). آن‌ها باید چندین ویژگی ضروری نظیر زیست سازگاری، زیست تخریب‌پذیری و فعالیت زیستی را داشته باشند. پلی‌لاکتیک اسید بسیاری از این ویژگی‌ها را دارد. از سویی دیگر، هیدروکسی آپاتیت با وجود خواص مکانیکی ضعیف، ماده‌ای زیست فعال با قابلیت هدایت استخوان‌سازی است که برای استفاده به‌صورت کامپوزیت در مهندسی بافت استخوان مناسب است (۱۸). بنابراین، ساخت یک داربست کامپوزیتی از پلی‌لاکتیک اسید و هیدروکسی آپاتیت برای دستیابی به خواص بهتر، مطلوب به نظر می‌رسد.

در این مطالعه رفتار سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف انسانی بر روی داربست‌های کامپوزیتی PLLA/HA و PLLA تهیه شده به روش الکتروریسی مورد مقایسه قرار گرفت. تصاویر حاصل از سلول‌های کشت شده بر روی داربست‌ها نشان‌دهنده این است که داربست‌های کامپوزیتی محیطی مناسب برای رشد درونی سلول‌ها فراهم کرده‌اند. در واقع خواص مواد به‌وسیله ساختار آن‌ها تعیین می‌شود، بنابراین دلیل اینکه نانو کامپوزیت ویژگی‌های بهتری را نشان می‌دهد، به ایجاد تغییر در ساختار آن برمی‌گردد. نتایج نشان داده‌اند، این خواص ناشی از ایجاد پیوند هیدروژنی بین

گروه‌های عاملی PLLA با HA است. پیوند هیدروژنی نیروی جاذبه بین اتم هیدروژن یک مولکول با بار الکتریکی اتم مولکول دیگر است. این پیوند در بسیاری از واکنش‌های بیوشیمیایی و تعیین خواص مواد، نقش مهمی بازی می‌کند. برخی محققین اشاره کرده‌اند، PLLA به‌طور مستقیم به‌وسیله پلیمریزاسیون حلقه باز L-لاکتیکی بر روی گروه‌های هیدروکسل سطح نانوذرات HA پیوند می‌خورد (۱۹، ۲۰).

با توجه به تصاویر میکروسکوب الکترونی می‌توان به این نکته پی برد، سلول‌ها دارای زوائد سیتوپلاسمی و ریخت‌شناسی طبیعی بوده که اغلب به شکل کلنی‌های سلولی در آمده و با سلول‌های مجاور ارتباطات متقابلی را ایجاد می‌کنند. همچنین نتایج نشان می‌دهند، سلول‌ها نه تنها توانایی اتصال و تکثیر مناسب‌تری روی نانو کامپوزیت‌ها دارند، بلکه به لحاظ ریخت‌شناسی نیز از شرایط طبیعی برخوردار هستند. در واقع حضور نانوذرات در سطح داربست جذب فیرونکتین و ویترونکتین‌ها را از سرم افزایش می‌دهد، این امر باعث پیش‌برد اتصال اینتگرینی آن‌ها به غشای سلولی می‌شود، که چنین پیوندهای اینتگرینی بازآرایی فیبرهای F-اکتین در اسکلت سلولی را القاء کرده و پاسخ سلولی را به سیگنال‌های تخصصی برای تکثیر و تمایز سلولی افزایش می‌دهد (۲۱). از طرفی برخی مطالعات نشان داده‌اند، ذرات HA باعث ایجاد سطوح خشن و ناهمواری در داربست‌ها می‌شود که باعث چسبندگی اولیه مناسب سلول‌ها بر روی این داربست‌ها می‌شود (۲۲). نمودارهای حاصل از تست MTT در روزهای مختلف هم اشاره به شرایط زیستی مناسب سلول‌ها در

سطح داربست‌ها دارد و البته میزان جذب نوری بالاتر در نمونه داربست کامپوزیت تأییدکننده، تأثیر مستقیم حضور نانو ذرات HA برای بهبود ویژگی سطحی برای اتصال هر چه بیشتر سلول‌ها بر روی داربست است.

در این مطالعه روند تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف به سلول‌های استخوان‌ساز روی داربست‌ها نیز مورد مقایسه قرار گرفت. یکی از تغییرات قابل بررسی در سلول‌های تمایز یافته به استئوبلاست، بررسی میزان رسوب کلسیم در این سلول‌هاست که حتی در تراکم بالای این سلول‌ها، ندول‌های استخوانی نیز تشکیل می‌شوند. در این بررسی رنگ‌آمیزی آلزارین قرمز که رسوبات کلسیمی را به رنگ قرمز درمی‌آورد، تمایز استئوبلاستی سلول‌ها را پس از ۷، ۱۴ و ۲۱ روز تیمار تحت محیط تمایز استئوبلاستی تأیید کرد. همچنین رنگ‌آمیزی ون کوسا در روز ۲۱ تمایز میزان رسوبات کلسیمی را مورد تأیید قرار داد، در حالی که رنگ‌آمیزی سلول‌های شاهد که در طول ۲۱ روز با محیط معمولی تیمار شده بودند، هیچ رسوب کلسیمی را نشان نداد. مقایسه نتایج رنگ‌آمیزی بیانگر میزان بالای تمایز در داربست کامپوزیت نسبت به داربست تنها و نمونه‌های سلولی است. کنگ و

همکاران در سال ۲۰۰۶ طی مطالعه بر روی داربست کایتوزان کامپوزیت با HA به نتیجه رسیدند که حضور ذرات HA باعث تقویت خاصیت زیست‌فعالی داربست استخوان‌ساز می‌شود (۲۳)، همچنین اسپاداکویی^۴ و همکاران در سال ۲۰۰۹، نشان دادند، داربست نانو کامپوزیت PLLA / HA الکترورسی شده، می‌تواند تمایز hMSCs را به سلول‌های غضروف‌القاء کند که با تولید ماتریکس پروتئوگلیکانی همراه است، هدف از این مطالعه توجه به نقش فوق العاده HA در ترمیم غضروف بود (۲۴). نتایج مشابهی از میزان معدنی شدن

در داربست‌های حاوی HA توسط Francis و همکارانش در سال ۲۰۱۰ نیز گزارش شده است (۲۱).

تحقیقات نشان داده است، مقدار و چگونگی توزیع ذرات HA بر روی داربست، میزان تخریب الیاف داربست را تحت تأثیر قرار می‌دهد و این حالت به خاصیت قلیایی HA برمی‌گردد که میزان تخریب را به میزان قابل توجهی کاهش می‌دهد (۲)، باتوجه به اینکه در تجربه حاضر از درصد HA کمتری (۱۰ درصد) نسبت به مطالعات مذکور استفاده شده است، اما میزان تمایز یافتگی و معدنی شدن ماتریکس تا حد مطلوبی افزایش یافته است. بخشی از این تفاوت را می‌توان به منبع سلولی بکار رفته نسبت داد، چون سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف در مقایسه با سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان بکار رفته در مطالعات مشابه از توان تمایزی بالاتری برخوردار است (۱۳). HA تشکیل بافت استخوانی را به وسیله افزایش چسبندگی سلول‌ها، افزایش خاصیت استخوان‌سازی داربست و رسوب مواد معدنی حاوی کلسیم بر سطح داربست به‌طور قابل توجهی بهبود می‌بخشد (۱۵، ۲۵).

نتیجه‌گیری

سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از بند ناف جنین انسانی در سطح داربست کامپوزیت PLLA/HA نسبت به داربست PLLA خالص و محیط دو بعدی به مراتب تمایز بیشتری را نشان می‌دهد. بنابراین به نظر می‌رسد، داربست‌های کامپوزیتی PLLA/HA کاندیدای مناسبی برای مهندسی بافت استخوان هستند و امید می‌رود، در آینده بتوان در کاربردهای پزشکی از آن استفاده کرد.

⁴ SPADACCIO

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از معاونت پژوهشی مرکز درمان ناباروری و سلول درمانی جهاد دانشگاهی استان اردبیل

و همچنین آزمایشگاه جنین‌شناسی و سلول‌های بنیادی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل بابت مساعدت علمی و مالی بی‌دریغ در انجام این پژوهش قدردانی می‌شود.

References

1. Burg KJ, Porter S, Kellam JF. Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2000;21(23):2347-2359.
2. Jordan J, Jacob KI, Tannenbaum R, Sharaf MA, Jasiuk I. Experimental trends in polymer nanocomposites—a review. *Materials science and engineering: A*. 2005;393(1-2):1-11.
3. Meinel L, Hofmann S, Karageorgiou V, Zichner L, Langer R, Kaplan D, et al. Engineering cartilage-like tissue using human mesenchymal stem cells and silk protein scaffolds. *Biotechnol Bioeng*. 2004;88(3):379-391.
4. Sharma B, Elisseeff JH. Engineering structurally organized cartilage and bone tissues. *Ann Biome Eng*. 2004;32(1):148-159.
5. Schieker M, Seitz H, Drosse I, Seitz S, Mutschler W. Biomaterials as scaffold for bone tissue engineering. *European journal of trauma*. 2006;32(2):114-124.
6. Langer R, Tirrell DA. Designing materials for biology and medicine. *Nature*. 2004;428(6982):487-492.
7. Reed CR, Han L, Andrad A, Caballero M, Jack MC, Collins JB, et al. Composite tissue engineering on polycaprolactone nanofiber scaffolds. *Ann plast sur*. 2009;62(5):505-512.
8. Pham QP, Sharma U, Mikos AG. Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: a review. *Tissue eng*. 2006;12(5):1197-211.
9. Hubbell JA. Biomaterials in tissue engineering. *Nature Biotechnology*. 1995;13(6):565-576.
10. Mansourizadeh F, Asadi A, Oryan S, Nematollahzadeh A, Dodel M, Asghari-Vostakolaei M. PLLA/HA Nano composite scaffolds for stem cell proliferation and differentiation in tissue engineering. *Molecular Biology Research Communications*. 2013;2(1):1-10.
11. Chen JP, Su CH. Surface modification of electrospun PLLA nanofibers by plasma treatment and cationized gelatin immobilization for cartilage tissue engineering. *Acta Biomater*. 2011;7(1):234-243.
12. Cao D, Wu YP, Fu ZF, Tian Y, Li CJ, Gao CY, et al. Cell adhesive and growth behavior on electrospun nanofibrous scaffolds by designed multifunctional composites. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2011;84(1):26-34.
13. Qiao C, Xu W, Zhu W, Hu J, Qian H, Yin Q, et al. Human mesenchymal stem cells isolated from the umbilical cord. *Cell Biol Int*. 2008;32:8-15.
14. Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood*. 2004;103(5):1669-1675.
15. Holzwarth JM, Ma PX. Biomimetic nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2011;32(36):9622-9629.

16. Ma PX. Biomimetic materials for tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008;60(2):184-198.
17. Marolt D, Campos IM, Bhumiratana S, Koren A, Petridis P, Zhang G, et al. Engineering bone tissue from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci.* 2012;109(22):8705-8709.
18. Tian T, Jiang D, Zhang J, Lin Q. Fabrication of bioactive composite by developing PLLA onto the framework of sintered HA scaffold. *Materials Science and Engineering: C.* 2008;28(1):51-56.
19. Agarwal S, Wendorff JH, Greiner A. Use of electrospinning technique for biomedical applications. *Polymer.* 2008;49(26):5603-5621.
20. Sill TJ, von Recum HA. Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials.* 2008; 29(13):1989-2006.
21. Francis L, Venugopal J, Prabhakaran MP, Thavasi V, Marsano E, Ramakrishna S. Simultaneous electrospin-electrosprayed biocomposite nanofibrous scaffolds for bone tissue regeneration. *Acta biomater.* 2010;6(10):4100-4109.
22. Lao L, Wang Y, Zhu Y, Zhang Y, Gao C. Poly (lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite nanofibrous scaffolds fabricated by electrospinning for bone tissue engineering. *Journal of Materials Science: J Mater Sci Mater Med.* 2011;22(8):1873-84.
23. Kong L, Gao Y, Lu G, Gong Y, Zhao N, Zhang X. A study on the bioactivity of chitosan/nano-hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *European Polymer Journal.* 2006;42(12):3171-3179.
24. Spadaccio C, Rainer A, Trombetta M, Vadalá G, Chello M, Covino E, et al. Poly-L-lactic acid/hydroxyapatite electrospun nanocomposites induce chondrogenic differentiation of human MSC. *Ann Biomed Eng.* 2009;37(7):1376-1389.
25. Carletti E, Motta A, Migliaresi C. Scaffolds for tissue engineering and 3D cell culture. *3D cell culture: Methods Mol Biol.* 2011; 17-39.